



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZMĚNY OBSAHU ENZYMU RUBISCO U SMRKU ZTEPILÉHO PŘIROZENĚ ROSTOUCÍHO V GRADIENTU NADMOŘSKÝCH VÝŠEK

THE CHANGES OF RUBISCO AMOUNT IN NORWAY SPRUCE GROWN AT GRADIENT OF
ALTITUDES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

TERESA TOMASZ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0910/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Teresa Tomasz	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Změny obsahu enzymu Rubisco u smrku ztepilého přirozeně rostoucího v gradientu nadmořských výšek

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je ověřit hypotézu, že se vzrůstající nadmořskou výškou dochází k poklesu obsahu enzymu Rubisco v listech/jehlicích dřevin.

V teoretické části práce pojednat o fotosyntéze a enzymu Rubisco.

V experimentální části stanovit obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích smrku ztepilého z různých nadmořských výšek metodou SDS-PAGE. Na základě provedených analýz potvrdit nebo vyvrátit výchozí hypotézu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Teresa Tomasz
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Práce se zabývá rozdíly obsahu enzymu Rubisco v jehlicích smrku ztepilého (*Picea abies* L.) rostoucího v různých nadmořských výškách, tedy při různých koncentracích oxidu uhličitého. Vzorky pocházely z Jeseníků a sběr provedlo Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i. Ve třech nadmořských výškách – nízké (low, L), střední (medium, M), vysoké (high, H) – byly sesbírány z celkem 39 smrků (13 smrků v každé nadmořské výšce) vzorky slunných a stinných jehlic. Pro separaci Rubisco byla použita metoda SDS-PAGE, obsah byl stanoven počítačovou denzitometrií.

Výsledky u slunných jehlic potvrdily hypotézu, že obsah Rubisco klesá se vzrůstající nadmořskou výškou, avšak u stinných jehlic nebyl prokázán významný vliv nadmořské výšky na obsah enzymu Rubisco. V nízké nadmořské výšce byl obsah Rubisco statisticky významně vyšší u slunných jehlic ve srovnání se stinnými jehlicemi. Ve střední a vysoké nadmořské výšce nebyl zjištěn významný rozdíl mezi slunnými a stinnými jehlicemi.

KLÍČOVÁ SLOVA

obsah enzymu Rubisco, smrk ztepilý, gradient nadmořských výšek, fotosyntéza, SDS-PAGE

ABSTRACT

The study deals with differences of Rubisco enzyme content in Norway spruce needles (*Picea abies* L.) growing at different altitudes, thus at different concentrations of carbon dioxide. The collection of samples was performed in Jeseníky by Global Change Research Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic. The samples of exposed and shaded needles were collected from 39 spruce trees in three altitudes – low (L), medium (M) and high (H). To separate Rubisco enzyme, the SDS-PAGE method was used, the content of Rubisco was determined by computer densitometry.

The results of exposed needles confirmed that Rubisco content decreases with increasing altitude, however, in the case of shaded needles, there was no proof of a significant influence of altitudes on Rubisco enzyme amount. At low altitude, Rubisco content was significantly higher in exposed needles in comparison with shaded needles. At medium and high altitude no significant difference was detected between exposed and shaded needles.

KEYWORDS

enzyme Rubisco content, Norway spruce, gradient of altitudes, photosynthesis, SDS-PAGE

TOMASZ, T. *Změny obsahu enzymu Rubisco u smrku ztepilého přirozeně rostoucího v gradientu nadmořských výšek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 36 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT v Brně.

.....
podpis autora

Poděkování:

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, PhD., za veškerou pomoc, cenné rady, připomínky a materiály, za věnovaný čas a odborné vedení mé bakalářské práce, a také doc. Mgr. Otmaru Urbanovi, PhD., za užitečné konzultace, materiály a rady.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Fotosyntéza	9
2.1.1	Primární fáze fotosyntézy (světelná fáze)	9
2.1.2	Sekundární fáze fotosyntézy (Calvinův cyklus, temnostní fáze)	11
2.1.3	Fotorespirace (světelné dýchání)	12
2.1.4	Význam fotosyntézy	13
2.2	Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)	14
2.2.1	Struktura	14
2.2.2	Biosyntéza	15
2.2.3	Aktivace Rubisco.....	16
2.2.3.1	Aktivní místo.....	16
2.2.3.2	Aktivace	17
2.2.3.3	Regulace aktivity.....	17
2.2.4	Karboxylace a oxygenace	18
2.3	Metody stanovení obsahu enzymu Rubisco	19
2.3.1	ELISA	19
2.3.2	Gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	19
2.3.3	Radioimunosrážecí technika.....	22
2.3.4	Kapilární elektroforéza	22
2.3.5	HPLC	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Materiál	23
3.2	Stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE	23
3.2.1	Přístroje.....	23
3.2.2	Chemikálie.....	23
3.2.3	Příprava roztoků	24
3.2.3.1	Roztoky pro přípravu gelů	24
3.2.3.2	Pomocné roztoky.....	24
3.2.3.3	Roztoky k vizualizaci bílkovin.....	24
3.2.4	Příprava gelů.....	24
3.2.4.1	Separační gel	25
3.2.4.2	Zaostřovací gel	25
3.2.5	Příprava standardu	25

3.2.6	Příprava vzorků.....	25
3.2.7	Elektroforéza	26
3.2.8	Zviditelnění bílkovin	26
3.2.9	Vyhodnocení gelů.....	27
3.2.10	Výpočet.....	27
3.2.11	Statistické zpracování výsledků.....	28
4	VÝSLEDKY.....	29
5	DISKUSE	31
6	ZÁVĚR.....	32
7	POUŽITÁ LITERATURA	33
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	36

1 ÚVOD

Fotosyntéza je jedním z nejstarších a současně nejdůležitějších dějů v živé přírodě. Jde o biologický proces přeměny světelné energie na chemickou, při kterém je uhlík ve vysoce oxidované formě o nízké energii převáděn na vysoce energetickou redukovanou formu. Jedná se o endergonický redukční proces, kde energii poskytuje sluneční záření, zachycované fotoreceptory (chlorofylem) a redukční síla pochází u vyšších zelených rostlin z vodíku vody.

Na tomto procesu se významně podílí enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco), který je považován za nejrozšířenější protein na Zemi. Katalyzuje vazbu atmosférického CO₂ na organickou sloučeninu (karboxylaci) a tvoří tak vstupní bránu anorganického uhlíku do biosféry. Katalyzuje také fixaci molekuly kyslíku na tutéž organickou molekulu (oxygenaci).

Rubisco se vyznačuje velmi malou molekulovou aktivitou, jeho číslo obratu činí necelé 3 molekuly substrátu za sekundu, kdežto u typického enzymu je to asi 1000 molekul substrátu za sekundu. Aby se udržela dostatečná rychlost fotosyntézy, musí být tedy Rubisco přítomen ve velkém množství (až 50 % celkového množství rozpustných proteinů v listech).

V posledních letech je tento enzym předmětem mnohých výzkumů, které se zaměřují na přípravu efektivnějšího enzymu za pomoci genových manipulací. Tím by se otevřela cesta k podstatnému zvýšení výnosu hospodářských plodin. Zájem o porozumění a zdokonalení tohoto enzymu vyplývá také z aktuálního stavu globálního oteplování a zvyšující se koncentrace CO₂ v atmosféře a z následků tohoto faktu.

Krátkodobé zvýšení koncentrace CO₂ vede u rostlin ke zvýšení rychlosti fotosyntézy, avšak při delším působení zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny dochází postupně ke snižování rychlosti fotosyntézy vlivem hromadění sacharidů ve fotosyntetizující tkáni. Dále klesají také množství a aktivity některých enzymů včetně Rubisco, snižuje se obsah dusíku a rozpustných bílkovin v listech. Tento stav se označuje jako tzv. aklimační deprese.

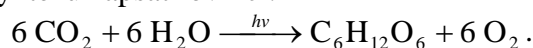
Předložená bakalářská práce je součástí rozsáhlého experimentu, který provádí Centrum pro výzkum globální změny AV ČR v.v.i. Cílem tohoto experimentu je zjistit vliv nadmořské výšky na různé fotosyntetické parametry (rychlost fotosyntézy, obsah chlorofylu, aktuální intenzitu fluorescence, rychlost elektronového transportu aj.) u smrku ztepilého. Úkolem této práce bylo posoudit vliv nadmořské výšky na obsah enzymu Rubisco u slunných a stinných jehlic smrku ztepilého rostoucího v přirozeném horském prostředí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších dějů v živé přírodě, protože ze sluneční energie a z nejjednodušší sloučeniny uhlíku, oxidu uhličitého, vyrábí organickou hmotu pro výživu chemotrofů. Současně je hlavním producentem kyslíku na naší planetě. Bylo odhadnuto, že fototrofní organismy zachytí ročně více než 10^{71} kJ energie a s její pomocí fixují asi $20 \cdot 10^{11}$ t CO_2 ze vzduchu a oceánů, vytvoří asi $14 \cdot 10^{11}$ t organické hmoty a uvolní do atmosféry $14 \cdot 10^{11}$ t O_2 .

Z chemického pohledu fotosyntéza představuje velmi náročný děj: převádí uhlík z nejvíce oxidované formy o nízké energii – oxidu uhličitého – na redukovaný materiál o vysoké energii – sacharidy. Tento proces je silně endergonický, energii poskytuje sluneční záření, které je zachycované fotoreceptory, redukční činidlo – elektrony a ionty H^+ – pochází u zelených rostlin z vodíku vody. Redukce CO_2 na cukry je spojena s oxidací H_2O za vzniku O_2 . Zjednodušeně lze fotosyntézu zapsat rovnicí:

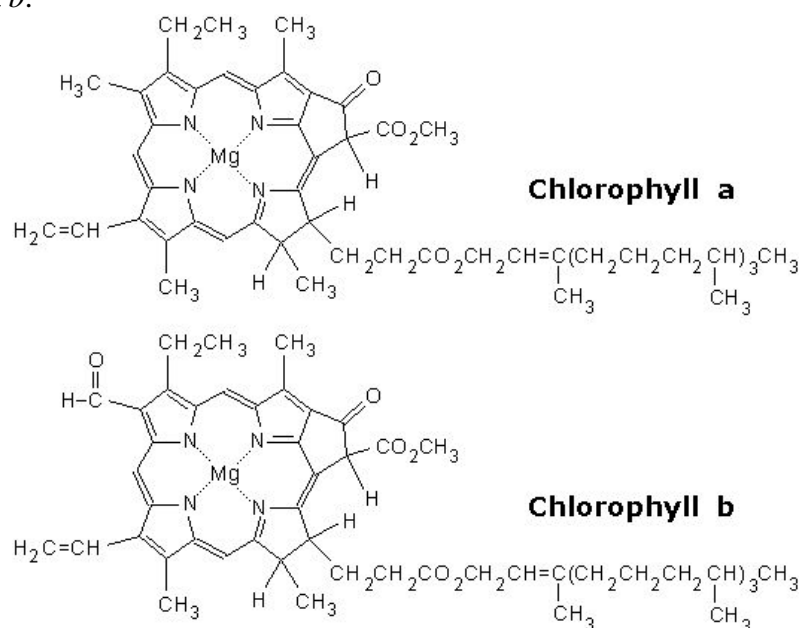


Fotosyntéza probíhá ve dvou oddělených fázích, které na sebe navazují – primární (světelná) fáze a sekundární (temnostní) fáze [1,2].

2.1.1 Primární fáze fotosyntézy (světelná fáze)

Primární fáze fotosyntézy je fotochemický děj, v průběhu kterého dochází k absorpci světla a k přeměně jeho energie na chemickou energii. Energie záření se nejdříve mění na energii excitovaných elektronů a ta se pak využívá pro výrobu makroergických sloučenin – ATP a NADPH. Vše je realizováno pomocí fotosyntetického aparátu, který se skládá ze tří částí:

- Fotoreceptory, nazývané chlorofyly – zachycují sluneční energii. Jsou to sloučeniny umístěné v kvantosomech tylakoidů, vážou se na molekuly speciálních proteinů. Strukturně se jedná o substituované tetrapyrroly, které ve svém centru koordinačně vážou kation hořčíku. Podle substituce na jednom z pyrrolových kruhů rozlišujeme chlorofyl *a* a *b*.

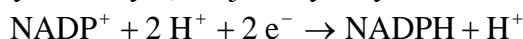


Obrázek 1: Struktura chlorofylu *a*, *b*. Převzato z [3].

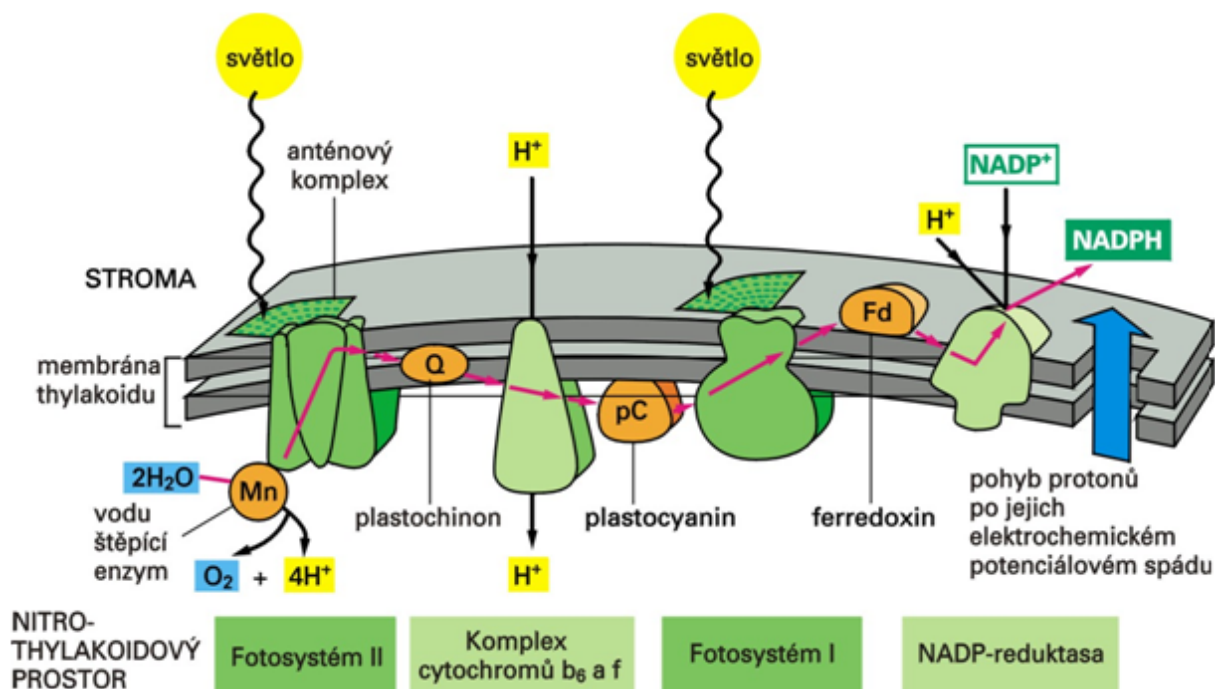
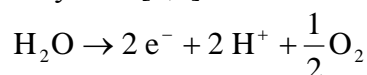
- b) Fotosyntetické reakční centrum – mění světelnou energii na elektrickou tak, že provádí excitaci elektronů molekuly chlorofylu absorbovaným zářením.
- c) Řetězec oxidoreduktas – přeměňuje energii excitovaných elektronů na energii chemickou, tvorba ATP a NADPH [1].

V prvním kroku fotosyntézy dochází k absorpci záření chlorofylovými molekulami, které jsou díky vazbám na speciální proteiny udržovány v optimálním směru tak, aby si mohly předávat absorbovanou energii. Nashromážděná energie je pak přenesena na molekulu chlorofylu *a* v reakčním centru a dochází k přechodu některých elektronů chlorofylu do hladiny o vyšší energii. Excitované elektrony se absorpcí fotonů uvolní od molekuly chlorofylu a projdou systémem přenašečů o stoupajícím redoxpotenciálu. Tyto elektrony se vrátí do základního stavu v molekule chlorofylu reakčního centra a část energie excitovaných elektronů se využije k výrobě ATP. Systém transportu elektronů, který začíná a končí v molekule chlorofylu reakčního centra (současně donor i akceptor elektronů), se nazývá cyklická fotofosforylace.

Energii světlem excitovaných elektronů lze uložit i do NADPH a vyrobit tak energii bohaté redukovaadlo. Tento děj nazýváme necyklickou fotofosforylací, jelikož excitované elektrony se nevracejí zpět do molekuly chlorofylu, ale jsou využity k redukci NADP⁺:



Pro regeneraci chlorofylu do původního stavu je třeba použít elektrony z oxidace jiné sloučeniny. U oxygenní fotosyntézy jsou chybějící elektrony v chlorofylu dodávány fotolýzou vody, při níž dochází k uvolňování kyslíku [1,4]:



Obrázek 2: Schematické znázornění světelné fáze fotosyntézy: přenos elektronů (znázorněno růžovou barvou) vzniklých z fotolýzy vody elektronovými přenašeči pomocí sluneční energie absorbované fotosystémy I a II. Převzato z [5].

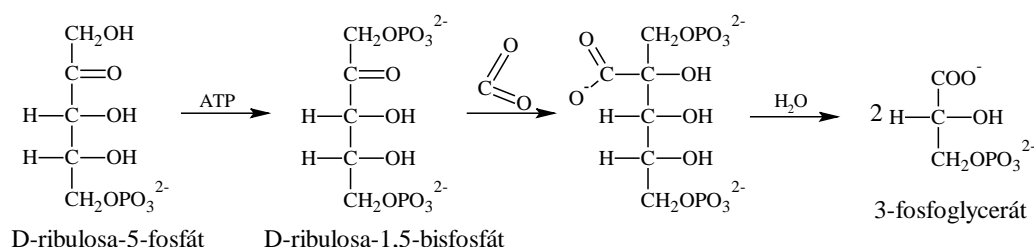
2.1.2 Sekundární fáze fotosyntézy (Calvinův cyklus, temnostní fáze)

Sekundární fáze fotosyntézy je sérií enzymových reakcí, které využívají energii ATP a redukovaný koenzym NADPH, vznikající v primární fázi, k biosyntéze sacharidů z CO_2 . Probíhá za tmy, do doby vyčerpání zásob ATP a NADPH, nepotřebuje energii slunečního záření. Je realizována v kapalně části chloroplastu (stromatu) a v cytosolu. Reakce temnostní fáze pobíhají několika metabolickými cestami v cyklických dějích, z nichž nejznámější je Calvinův cyklus.

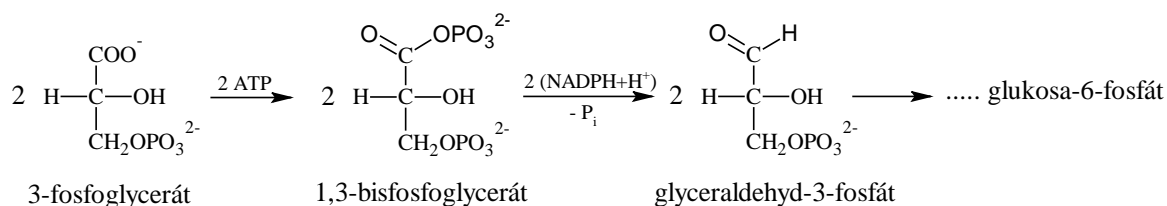
Průběh Calvinova cyklu sestává ze tří fází:

- a) Fixace oxidu uhličitého ve formě karboxylu na pětiuhlíkatý cukerný derivát ribulosa-1,5-bisfosfát za vzniku nestabilní šestiuhlíkaté sloučeniny, která podléhá rozpadu na dvě tříuhlíkaté molekuly 3-fosfoglycerátu.

Tato část Calvinova cyklu slouží k převedení energeticky chudé, nereaktivní formy CO_2 na aktivovanou redukovatelnou formu pomocí zabudování CO_2 ve formě karboxylu do 3-fosfoglycerátu za katalýzy enzymem ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou/oxygenasou.

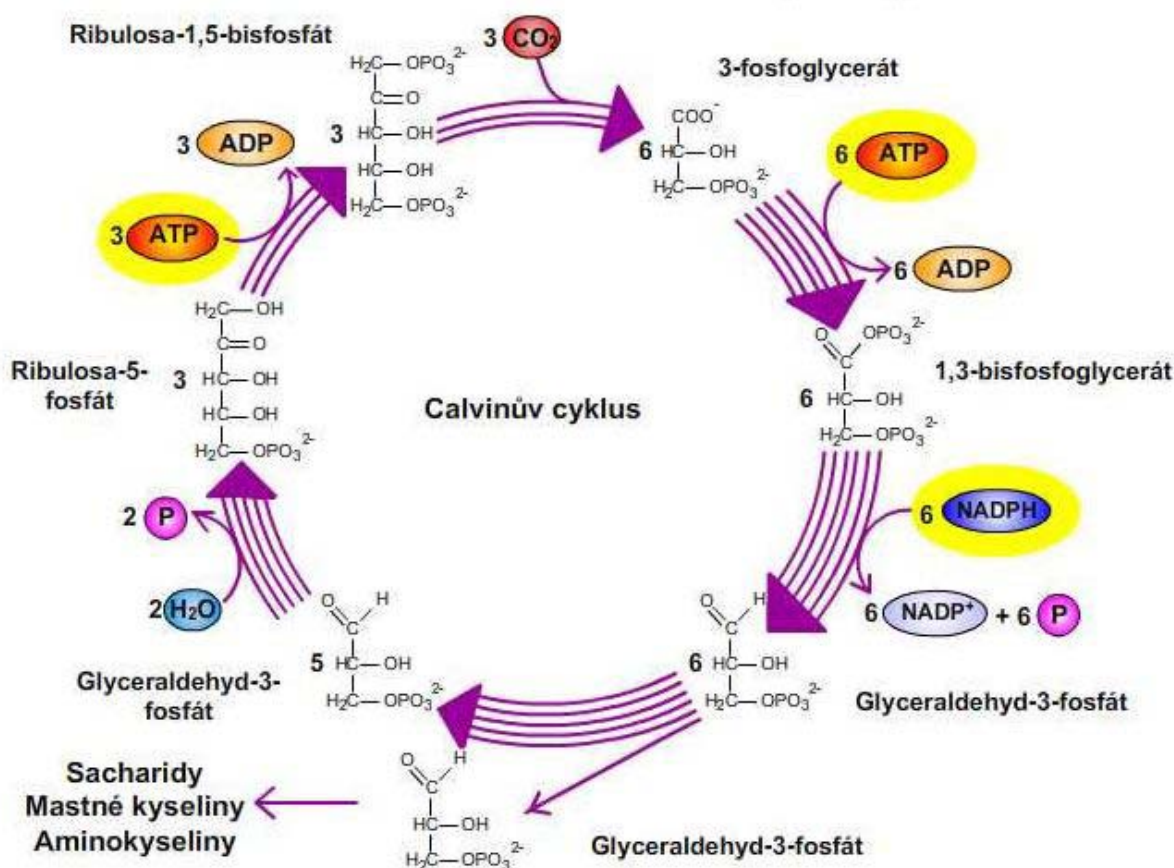


- b) Redukce 3-fosfoglycerátu za vzniku hexosy – probíhá přes fosforylaci za spotřeby ATP na 1,3-bisfosfoglycerát, následně dochází k jeho redukci pomocí molekuly NADPH na glyceraldehyd-3-fosfát, ze kterého pak izomerací vzniká dihydroxyacetonfosfát. Část trios přechází vnější chloroplastovou membránou do cytosolu, kde se aldolovou kondenzací (katalyzována aldolasou) přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát a následně odštěpením fosforylové skupiny a izomerací vzniká glukosa-6-fosfát.



- c) Regenerace akceptoru CO_2 – ribulosa-1,5-bisfosfátu – je obrácenou regenerační fází pentosového cyklu. Probíhá složitým procesem přes řadu reakcí vzájemných přeměn cukrů.

V průběhu jednoho cyklu vznikne z pentosy hexosa za využití jednoho atomu uhlíku z atmosférického oxidu uhličitého. K tvorbě hexosy musí cyklus proběhnout šestkrát [1,2].



Obrázek 3: Schéma Calvinova cyklu. Převzato z [6].

2.1.3 Fotorespirace (světelné dýchání)

Fotorespirace je děj, který nastává v prostředí vysoké koncentrace O_2 a nízké koncentrace CO_2 . Dochází při ní k navázání kyslíku na ribulosa-1,5-bisfosfát za katalýzy enzymem ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou/oxygenasou, což vede k rozpadu na 2-fosfoglykolát a 3-fosfoglycerát. Fosfoglykolát je v peroxisomech účinkem O_2 přeměňován na glyoxylát za vzniku peroxidu vodíku, který je rozkládán katalasou. Část glyoxylátu je oxidována na oxalát a zbylý produkt fotorespirace je transaminací přeměňován na glycin, který přechází do mitochondrií a dále se kondenzuje na serin za odštěpení CO_2 , k tomu se spotřebovávají dvě molekuly glycinu. Serin se pak vrací do peroxisomů a pomocí transaminace se mění na hydroxypyruvát, ten se redukuje na glycerát a přechází do cytosolu, kde dochází k fosforylaci glycerátu na 3-fosfoglycerát, jenž vstupuje do Calvinova cyklu. Dochází tedy k plýtvání ATP a NADPH vytvořenými fotosyntézou.

Některé rostliny se dokázaly adaptovat k ztrátovému světelnému dýchání tím, že svou metabolickou dráhou (Hatch-Slackovým cyklem) kumulují CO_2 a potlačují tak fotorespiraci. Jsou to tzv. C_4 -rostliny, patří mezi ně kukuřice, třtina cukrová a jiné rostliny vyskytující se hlavně v tropickém, tedy horkém a slunečném prostředí, jelikož pro průběh C_4 -cyklu vyžadují velké množství energie.

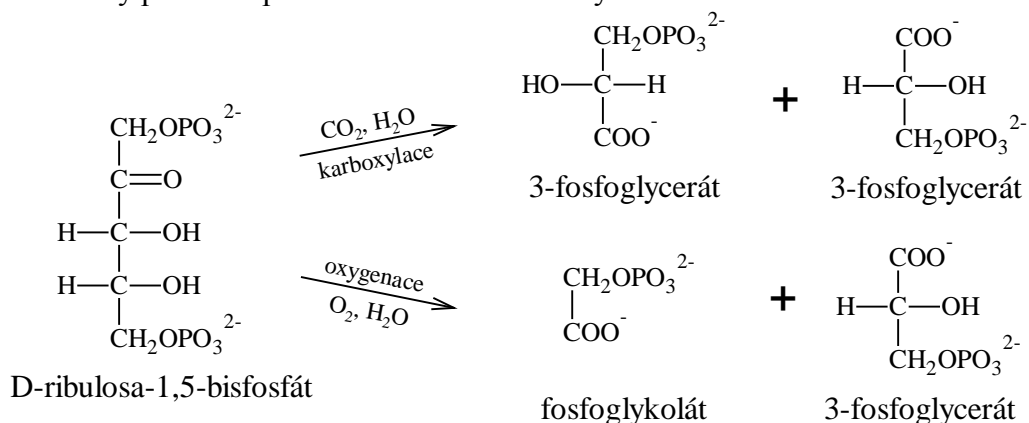
Oxid uhličitý a kyslík spolu tedy soutěží jako substrát pro bifunkční enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasu/oxygenasu (Rubisco) a světelné dýchání je konkurenčním dějem ke Calvinově cyklu [1,4].

2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)

Rubisco bylo objeveno v roce 1947 vědci Wildmanem a Bonnerem [8]. Při elektroforéze extraktu z listů získali tehdy neznámý protein, který tvořil významný hmotnostní podíl rostlinných listů a nazvali ho Frakce I. V dalších studiích, které provedli v následující dekádě Calvin a Massini [9], Quayle a kol. [10], Weissbach a kol. [11], byla prokázána existence enzymu, který v průběhu fotosyntézy katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu za vzniku dvou molekul 3-fosfoglycerátu. Ale až Trown [12] v 1965 roce dokázal spojitost tohoto enzymu s Frakcí I a enzym byl nazván ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa. Později byla Bowesem a kol. [13], Andrewsem a kol. [14], Lorimerem a kol. [15] objevena druhá katalytická aktivita enzymu, oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu na molekuly fosfoglykolátu a fosfoglycerátu. Enzym byl tedy přejmenován na ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa a později se začala používat zkratka Rubisco [16].

Předpokládá se, že Rubisco je nejhojněji zastoupeným proteinem na světě a tvoří 16 % hmotnosti bílkoviny chloroplastů [17]. Kvůli své nízké katalytické účinnosti ($k_{\text{kat}}=2\text{--}12\text{ s}^{-1}$) musí být tento enzym v rostlinách přítomen v obrovském množství, které zaručí přijatelnou rychlost fotosyntézy [16].

Rubisco se tedy podílí na průběhu reakcí znázorněných na obrázku 5:



Obrázek 5: Karboxylace a oxidace RuBP katalyzované enzymem Rubisco. Převzato z [16].

2.2.1 Struktura

V přírodě se Rubisco vyskytuje v různých formách, které se rozlišují hlavně přítomností nebo absencí malých podjednotek (S), jejichž relativní molekulová hmotnost je 12–18 kDa. Všechny formy obsahují několik velkých podjednotek (L) o relativní molekulové hmotnosti 50–55 kDa. Nejběžnější formy Rubisco jsou I a II.

Forma I je hexadekamer L_8S_8 , z osmi L podjednotek a z osmi S podjednotek, které tvoří čtyřboký hranol. Nachází se u všech vyšších rostlin a také u většiny chemoautotrofních bakterií, cyanobakterií a řas.

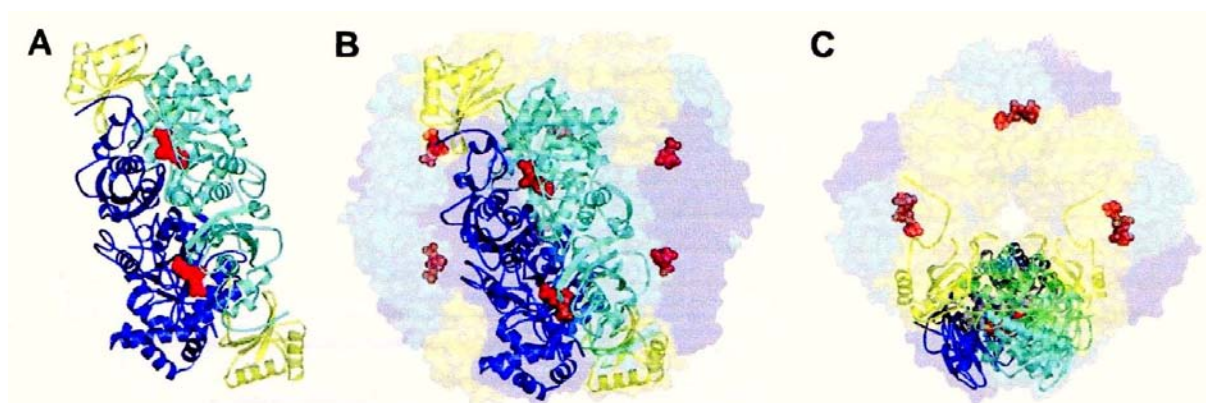
Forma II sestává pouze z velkých podjednotek, je dimerem $(\text{L}_2)_n$ a postrádá malé podjednotky. Vyskytuje se u anaerobních purpurových bakterií, u obrněnek a některých chemoautotrofních bakterií [18].

Velké podjednotky vykazují katalytickou schopnost, jelikož se v nich nachází aktivní místo a jsou tedy enzymově aktivní i bez přítomnosti S podjednotek. Podjednotky L jsou kódovány v chloroplastové DNA. Sekundární struktura velkých podjednotek je u všech forem Rubisco podobná, tvoří ji menší N-terminální doména, která je složena ze čtyř až pěti úseků s β -vlákn

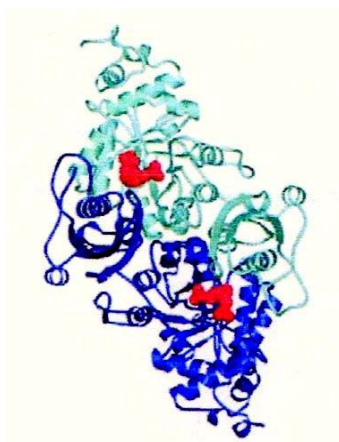
a dvěma α -helixy. Větší C-terminální doména má soudkovitý tvar skládající se z osmi následných β - α -jednotek.

Malé podjednotky jsou kódovány jaderným genem a jsou více rozmanité. Nejběžnější struktura malé podjednotky je tvořena ze čtyř úseků antiparalelních β -struktur s dvěma α -helixy na jedné straně.

Aktivní centrum se nachází mezi C-terminální doménou jedné L podjednotky a N-terminální doménou sousední L podjednotky, proto je katalyticky aktivní pouze dimer z velkých podjednotek [4,18].



Obrázek 6: Struktura Rubisco – forma I. L podjednotky jsou vyznačeny modře a tyrkysově, S podjednotky žlutě, červeně je zvýrazněn substrát navázaný na aktivní místo. A) Tetramer L_2S_2 formy I ze špenátu, B) a C) celý hexadekamer L_8S_8 z různých úhlů pohledu. Převzato z [18].



Obrázek 7: Struktura Rubisco – forma II. Dimer L_2 ze dvou velkých podjednotek (modrá a tyrkysová barva) se substrátem navázaným na aktivní místo (červeně). Převzato z [18].

2.2.2 Biosyntéza

U vyšších rostlin označujeme geny pro syntézu S podjednotek jako *rbcS* geny. Jsou umístěné v genomu jádra a tvoří malou multigenní rodinu s dvěma až dvanácti členy. *rbcS* geny obsahují jeden až tři introny a kódují bílkoviny o velikosti asi 120 aminokyselin. Malé podjednotky jsou syntetizovány v cytoplazmě a pomocí N-terminálního tranzitního peptidu jsou přeneseny do chloroplastu za spotřeby ATP. Po importu je transportní peptid odstraněn.

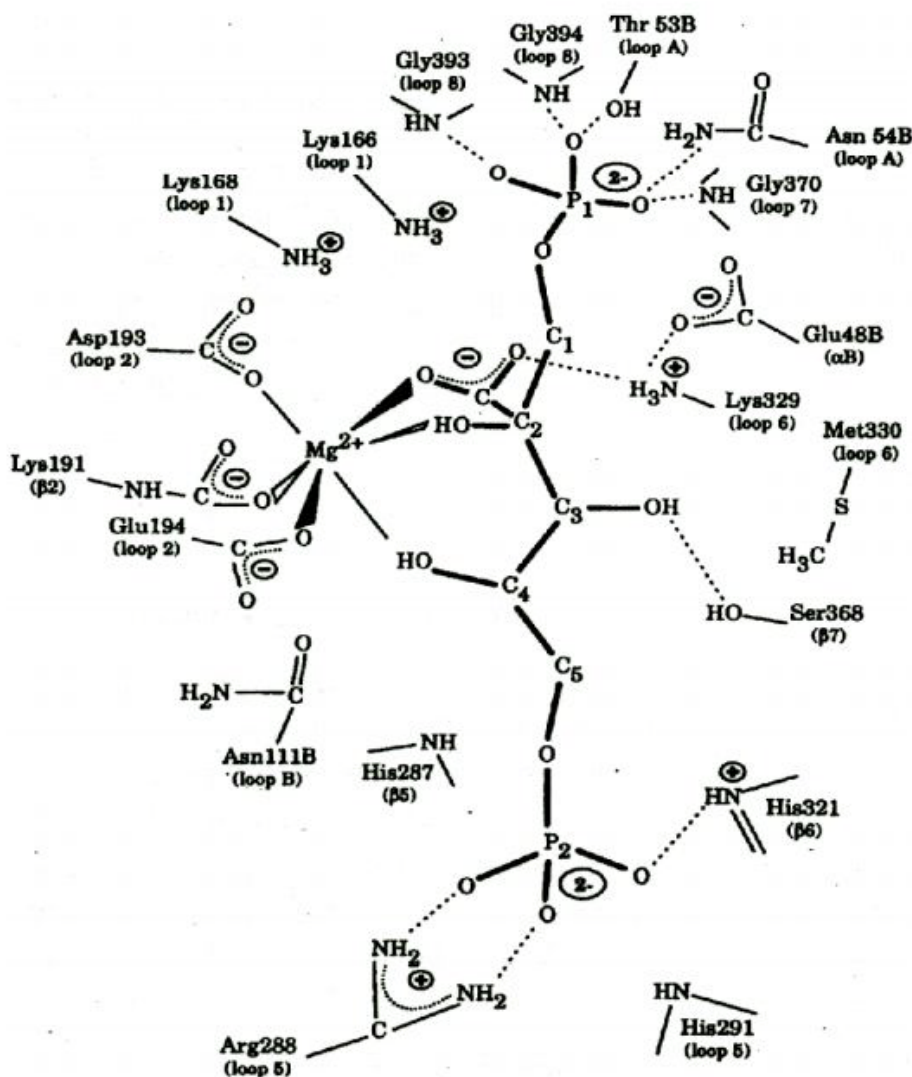
Geny, které u eukaryot kódují vznik L podjednotek, se nacházejí v genomu chloroplastu po jedné kopii. Chloroplasty ale obsahují mnoho kopií genomu, proto z nich lze určit několik shodných *rbcL* genů. Nejčastěji *rbcL* neobsahují introny a kódují přibližně 475 aminokyselin.

Po ukončení přenosu a úprav S podjednotek v chloroplastu dochází ke spojování s nasyntetizovanými L podjednotkami do L_8S_8 Rubisco holoenzymu. Značná část velkých podjednotek se spojuje v intermediáty s oligomerním proteinem chaperoninem cpn60, jež obsahuje podjednotky s molekulovou hmotností 60 kDa. S tvorbou nově vytvořených L podjednotek shromážděných do Rubisco ubývá binárních komplexů L podjednotek s cpn60 a umožní se tak připojení S podjednotek [19].

2.2.3 Aktivace Rubisco

2.2.3.1 Aktivní místo

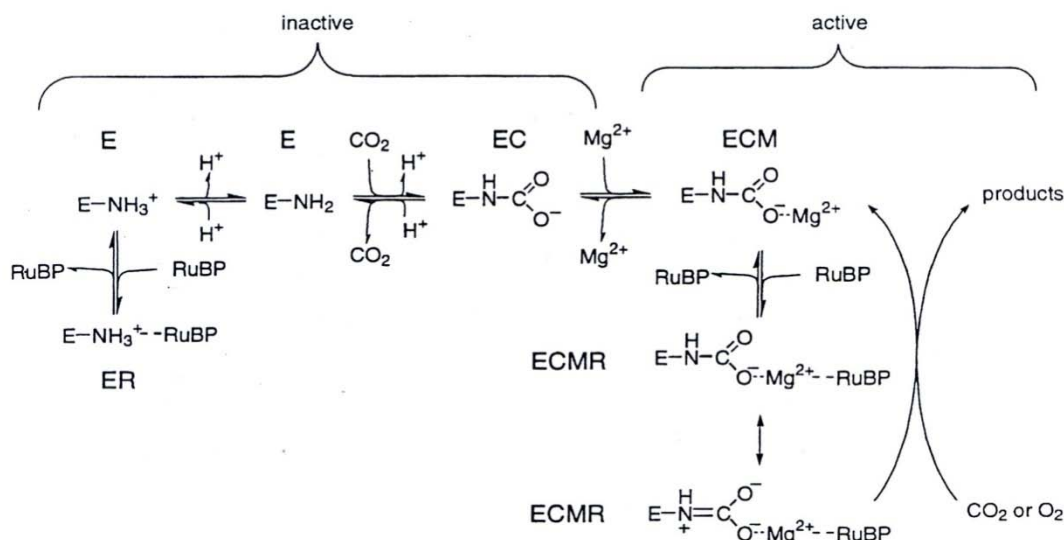
Aktivní místo enzymu Rubisco je zobrazeno na obrázku 8. N-terminální doména je tvořena Glu48, Thr53, Asn53 a Asn111, všechny ostatní zbytky jsou umístěny v β/α – stočené doméně přiléhající podjednotky. Nejdůležitější je v aktivním místě Lys191, jeho ϵ -aminoskupina je karbamylována molekulou CO_2 a vzniklý karbamát se stabilizuje pomocí iontu Mg^{2+} . Na takto karbamylované aktivní místo se váže RuBP a na jeho druhý uhlík C_2 se navazuje molekula vzdušného CO_2 [20].



Obrázek 8: Aktivní místo enzymu Rubisco. Převzato z [20].

2.2.3.2 Aktivace

Dříve než dojde k samotné katalýze, je zapotřebí Rubisco aktivovat. Tento proces probíhá přes karbamylaci, v průběhu které se molekula CO_2 naváže na ϵ -aminoskupinu lysinového zbytku (K201) v aktivním místě, a dále dochází ke stabilizaci karbamylovaného enzymu pomocí Mg^{2+} iontu. Aktivní místo je schopno přeměnit RuBP na produkty pouze tehdy, kdy je karbamát stabilizovaný kovem. Molekula CO_2 použitá k aktivaci se liší od molekuly CO_2 potřebné ke karboxylaci [16].



Obrázek 9: Aktivace Rubisco (E) karbamylací K201 za vzniku EC, následné navázání Mg^{2+} (vznik ECM). RuBP se může navázat na nekarbamylovanou formu (vznik ER) nebo karbamylovanou (vznik ECMR), která jediná podléhá katalýze. Převzato z [16].

Navázání substrátu nebo inhibitorů na neaktivovaný nebo pouze karbamylovaný enzym způsobuje uzamčení enzymu do neproduktivní formy. Rostliny v tomto případě dokážou odstranit pevně vázaný inhibitor pomocí Rubisco aktivasy za hydrolýzy ATP a obnovit tak aktivitu enzymu Rubisco [18].

2.2.3.3 Regulace aktivity

Rychlost fotosyntézy úzce souvisí s množstvím Rubisco, a to je ovlivněno rychlostí biosyntézy a katabolických dějů. Tyto procesy jsou regulovány genovou expresí, stabilitou informační RNA, syntézou polypeptidů, posttranslačními modifikacemi, shlukováním podjednotek do holoenzymu a dalšími faktory, které mají vliv na degradaci proteinu [21].

Významný vliv na průběh katalýzy enzymem Rubisco mají přírodní inhibitory. Jedním z nich je 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát (2CA1P). Jedná se o noční inhibitor, jež se váže na karbamylované Rubisco za sníženého světla a ve tmě. Dochází tak k blokaci aktivního centra, které je za světla znovu uvolněno pomocí Rubisco aktivasy. 2CA1P je poté defosforylován pomocí specifického enzymu 2CA1P-fosfatasy.

Dalšími inhibitory jsou analog RuBP xylulosa-1,5-bisfosfát (XuBP) a ketoisomer 3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát (3-KABP). XuBP navázaný na karbamylované Rubisco reaguje jako substrát a je pomalu přeměňován na 3-fosfoglycerát. Ale k nekarbamylovanému Rubisco se dokáže pevně navázat a enzym inaktivovat. Denní inhibitor, pentadiulosa-1,5-bisfosfát (PDBP), je tvořen eliminací H_2O_2 z peroxyketonového intermediátu oxygenace. PDBP se

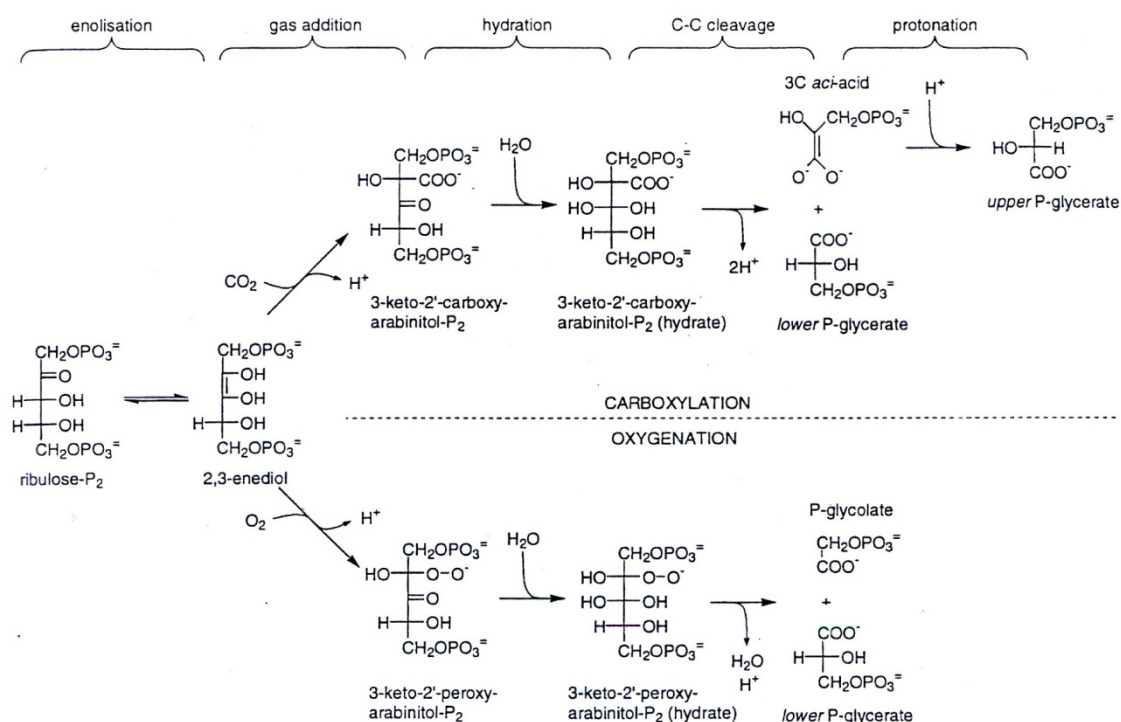
hromadí v aktivním místě a způsobuje postupnou inhibici. Také vysoká koncentrace substrátu RuBP způsobuje inaktivaci enzymu [19,21].

2.2.4 Karboxylace a oxygenace

Průběh karboxylace i oxygenace je analogický, skládá se z více kroků, v průběhu kterých jsou vytvářené podobné meziproducty. První dílčí reakce je v obou případech identická, RuBP je přeměněno na enediol, který dále reaguje s CO_2 nebo O_2 a v dalších krocích dochází k štěpení vazby mezi C_2 a C_3 . Mechanismus obou katalytických dějů se výrazně liší až konečnou protonací, ke které dochází při karboxylaci, nikoliv však při oxygenaci.

Katalytická karboxylace probíhá v pěti navazujících krocích. Prvním je zmiňovaná přeměna substrátu RuBP na enediol bez účasti druhého substrátu CO_2 , který se až v dalším kroku připojuje na C_2 2,3-enediolu a tvoří tak šestiuhlíkatý intermediát, jež je dále hydratován a přes protonaci karbaniontu je štěpen na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Tyto konečné produkty karboxylace jsou dalším sledem jiných reakcí fotosyntézy přeměňovány na sacharidy [16,19].

Enediol je schopný reagovat i s molekulou kyslíku a vytvořit peroxyderivát, který je opět za přítomnosti vody štěpen na molekulu 3-fosfoglycerátu a 2-fosfoglykolátu. Fosfoglykolát vchází do tzv. glykolátové cesty, kde dvě molekuly fosfoglykolátu zreagují na jednu molekulu CO_2 . V průběhu se spotřebovává jedna molekula ATP. Fotorespirace je tedy neefektivní proces, který ale rostlině poskytuje důležité metabolity jako např. glycin, serin [19,22].



Obrázek 10: Sled dílčích reakcí karboxylace a oxygenace. Převzato z [16].

2.3 Metody stanovení obsahu enzymu Rubisco

2.3.1 ELISA

ELISA (z ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), zkráceně označována EIA (Enzyme ImunoAssay – enzymová imunoanalýza), patří mezi citlivé neprecipitační imunochemické metody, které umožňují stanovit analyt v množství $10^{-12} - 10^{-9}$ g. Tyto metody detekují velice nízké koncentrace antigenu a protilátky, které netvoří precipitáty a nemohou být tedy stanoveny jinými, precipitačními technikami. Tak citlivé stanovení imunokomplexu antigen-protilátka je možné díky navázání vhodné značky na jeden z imunoreaktantů ještě před uskutečněním interakce antigen-protilátka. U ELISA se ke značení používají kovalentně navázané enzymy, nejčastěji peroxidasa a alkalická fosfatasa, které katalyzují přeměnu substrátu přidaného do reakční směsi. Stanovení množství konečného produktu enzymové reakce je vždy prováděno měřením změny absorbance, fluorescence nebo chemiluminiscence. Pro zjištění hodnoty koncentrace analytu je nutné sestavit kalibrační křivku za použití standardů [23].

Enzymová imunoanalýza může být provedena jako přímá kompetitivní, nepřímá kompetitivní nebo nekompetitivní. Nejčastěji se při ELISA používá pevného nosiče v podobě stěn jamek mikrotitračních destiček z tvrzeného polystyrenu, které jsou vhodné pro analýzu většího množství vzorků. Tyto destičky obsahují 96 jamek (12 v 8 řadách) o objemu 300 μ l. Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza je vhodná pouze pro polyvalentní antigeny, které umožňují vazbu dvou a více molekul protilátek. Nejprve dochází k interakci protilátky zakotvené na pevné fázi s antigenem v analyzovaném vzorku a po ustavení rovnováhy se systém promyje a na protilátkou zachycený antigen se naváže další protilátka značená enzymem. Po promytí se změří enzymová aktivita zachycena na pevnou fázi. U přímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy spolu soutěží neznačený a značený antigen o vazbu na protilátku zakotvenou v pevném nosiči. Po ustavení rovnováhy a po promytí se měří enzymová aktivita zachycena na pevnou fázi. U nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy rozlišujeme dvě fáze: první kompetitivní a druhou nekompetitivní. V první fázi spolu soutěží antigen zakotvený na pevný nosič se stanovovaným antigenem ze vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky přidávané do systému v roztoku spolu se stanovovaným antigenem. Čím více antigenu je obsaženo v analytu, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen a opačně. Po ustavení rovnováhy a promytí je v druhé fázi zjišťováno množství takto zprostředkovaně zakotvené protilátky použitím přidávané značené protilátky [23].

2.3.2 Gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (zkráceně SDS-PAGE) patří mezi elektromigrační (elektroforetické) metody, které využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Pokud jsou látky nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, pohybují se konstantní rychlostí, která je úměrná velikosti jejich nábojů. Anionty se blíží k anodě, kationty ke katodě. Ionty jsou v elektrickém poli uváděny do pohybu elektrickou silou F_E :

$$F_E = q \cdot E, \quad (1)$$

kde q je náboj částice a E je intenzita elektrického pole. V opačném směru působí odporová síla vnitřního tření F_F dána Stokesovým zákonem:

$$F_F = -6\pi\eta r v, \quad (2)$$

kde η je viskozita roztoku, r poloměr iontu a v rychlost pohybu iontu.

Při elektroforéze dochází k ustavení rovnováhy mezi silami F_E a F_F , obě síly mají stejnou hodnotu, ale jsou opačně orientovány:

$$qE = 6\pi\eta r v. \quad (3)$$

Pro rychlost pohybu iontu tedy platí:

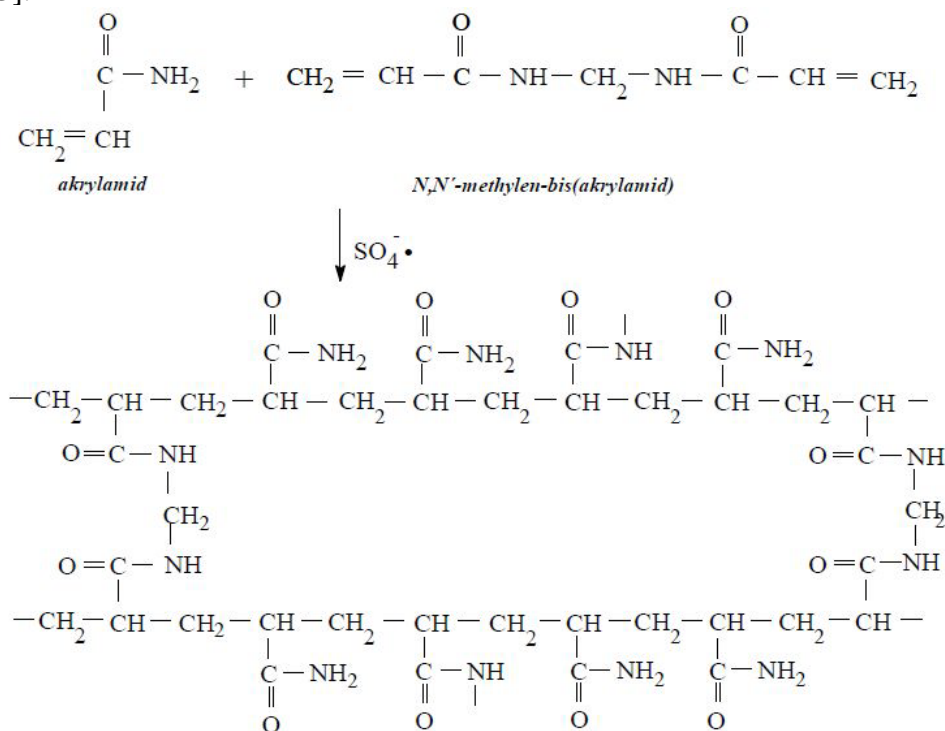
$$v = \frac{qE}{6\pi\eta r}. \quad (4)$$

A elektroforetická pohyblivost (mobilita) je definována jako rychlost pohybu nabitých částic ve stejnoměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}, \quad (5)$$

ale efektivní mobilita, tedy mobilita skutečně naměřena při elektroforéze, je většinou nižší než teoretická mobilita a závisí na různých faktorech jako např. na viskozitě prostředí, teplotě, pH roztoku, iontové síle a tedy i na koncentraci elektroforetického pufru [23].

Gelová elektroforéza se řadí mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody pro separaci makromolekul. Porézní gely způsobují dělení molekul na základě síťového efektu a zároveň podle elektroforetické pohyblivosti dělených látek. Velké molekuly se pohybují pomaleji než malé, jelikož gel úplně vyplňuje vymezený prostor. Nejčastěji je jako nosič používán polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný, průhledný a lze z něj tvořit nosiče s různými požadovanými vlastnostmi (hustota zesíťování gelu, gradient hustoty gelu). Je kopolymerem dvou monomerů: akrylamidu a N,N'-methylen-bis(akrylamidu). Jejich vzájemný poměr ovlivňuje fyzikální vlastnosti gelu, jako např. velikost pórů, křehkost a tvrdost gelu. Kopolymerace musí probíhat v roztoku pufru za přítomnosti iniciátoru peroxodisíranu amonného nebo riboflavinu. Působením světla dochází k rozkladu molekul iniciátoru za vzniku volných radikálů, které zahájí vlastní polymerační reakci. Ke stabilizaci radikálů je používán tetramethylethyldiamin (TEMED) nebo dimethylaminopropionitril (DMPN) [23].

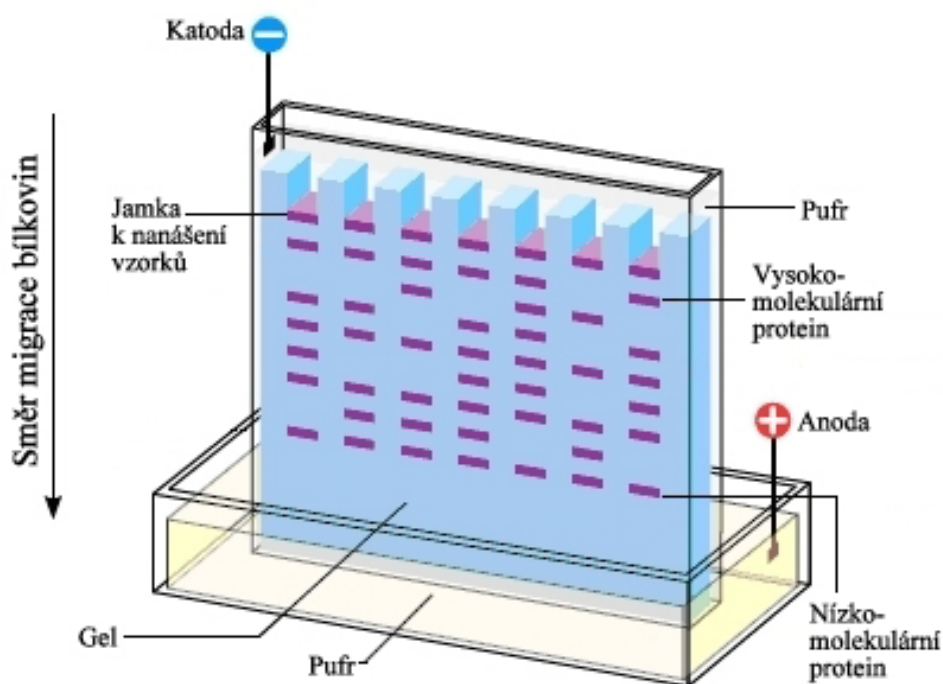


Obrázek 11: Chemická struktura polyakrylamidového gelu. Převzato z [23].

Pro separaci bílkovin se často provádí elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), překrývá vlastní náboj proteinu a uděluje jim uniformní, záporný náboj. Bílkoviny s navázaným SDS mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmotnosti a podobný, válcovitý tvar, a proto se bílkoviny při SDS-PAGE dělí na základě rozdílných molekulových hmotností. Další funkcí SDS je rušení nekovalentních interakcí mezi podjednotkami bílkovin, proto lze při kombinaci SDS s 2-merkaptethanolem, který redukuje disulfidové můstky, stanovit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek. Tato varianta gelové elektroforézy ale nepodává informace o nativním stavu bílkovin [23].

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu může být provedena diskontinuálně, při čem získáme velmi ostré zóny rozdělených bílkovin. Princip spočívá v použití dvou různých gelů – horního zaostřovacího, který bílkoviny zkoncentruje, a spodního dělicího, ve kterém dochází k separaci bílkovin podle elektroforetických pohyblivostí.

K detekci látek po elektroforéze se používá barvení pro zviditelnění rozdělených zón analytu. Nejčastěji se proteiny barví alkoholovým roztokem s barvivem Coomassie blue. Použitím tohoto roztoku se proteiny fixují, denaturují a tvoří se komplexy barvivo-protein, které vydrží i vymývání přebytku barviva kyselým roztokem nebo elektroforetickým odbarvením. Pro detekci menších koncentrací bílkovin (až 0,1 ng) se volí barvení stříbrem. Ke kvantifikaci se používá speciální software, který převádí jednotlivé zóny na píky a pro výpočet hodnoty koncentrace stanovovaného proteinu se porovnává plocha píku určitého proteinu s plochou píku standardu [23].



Obrázek 12: Aparatura používaná pro stanovení množství enzymu Rubisco pomocí gelové elektroforézy SDS-PAGE. Převzato z [24].

2.3.3 Radioimunosrážecí technika

Tato metoda využívá vysoce specifické reakce enzymu Rubisco s radioaktivně značeným 2-¹⁴C-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátem (CABP), jejímž produktem je radioaktivně vyzařující sraženina. Radioimunosrážecí techniku používá mnoho autorů pro stanovení obsahu enzymu Rubisco, mj. Kobza, Seemann [25], Seemann, Berry, Freas, Krump [26].

Nejprve je nutné získat z listů či jehličí extrakt obsahující enzym Rubisco pomocí ledového média bez přítomnosti CO₂. Následuje aktivace Rubisco inkubací v roztocích NaHCO₃ a MgCl₂, a poté reakce s CABP v přítomnosti protilátky se specifickou afinitou k Rubisco. Výsledná sraženina je zachycována na celulozoacetátovém filtru, promyta roztoky anorganických solí od nadbytku činidla CABP a stanovena přímo měřením vyzařované radiace. Tato metoda je nezávislá na přítomnosti jiných proteinů a k vyhodnocení je nutná kalibrace na standard Rubisco [27].

2.3.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi elektromigrační analytické metody. Je prováděna v tenkých křemenných, skleněných nebo plastových kapilárách o průměru obvykle menším než 100 μm, které lehce odvádějí teplo a tak se mohou použít elektrická pole s vysokým napětím, což snižuje čas pro rozdělení vzorku. V kapilárách může probíhat volná elektroforéza při použití pufru, kdy díky malému průměru kapilár nedochází ke konvekčnímu míchání a rozostřování zón, nebo elektroforéza v prostředích vykazujících síťový efekt jako polyakrylamidový nebo agarosový gel, deriváty celulosy, dextran či polyoxyethylen. Elektroforéza v síťovacích prostředích se používá pro dělení látek s odlišnou relativní molekulovou hmotností a velmi podobných nebo identickým specifickým nábojem, tedy komplexy bílkovin s SDS [28].

CE uvádí Warren a kol. [29] jako jednodušší a ekonomicky i časově výhodnější v porovnání s kapalinovou chromatografií či gelovou elektroforézou. U listů *Eucalyptus diversicolor* zkoumali vliv zdroje dusíku na množství Rubisco. Extrakce bílkovin byla provedena pomocí Tris pufru a pro selektivní vysrážení analyzovaných bílkovin byly použity roztoky kyseliny trichloroctové a chloridu draselného. Elektroforéza byla provedena za použití systému Bio-Rad 3000 a elektroforetického pufru CE-SDS v nepotažené křemenné kapiláře o průměru 50 μm, celkové délce 24 cm a efektivní délce 19,4 cm, při napětí 15 kV a teplotě 20 °C s UV detekcí při 220 nm. Mezi každým měřením byla kapilára promývána roztoky hydroxidu sodného, kyseliny chlorovodíkové a nakonec puftrem CE-SDS.

2.3.5 HPLC

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography) patří mezi kolonové chromatografické metody s kapalnou mobilní fází. Vysoká efektivita dělení složek vzorku je způsobena malým průměrem částic stacionární fáze, tedy větším specifickým povrchem a vyšší interakcí analytu s náplní, která tak klade mobilní fázi větší odpor a je potřeba pracovat při vysokém tlaku. O separaci rozhoduje afinita složek vzorku se stacionární i mobilní fází [30].

Pro stanovení koncentrace Rubisco ve vzorku se HPLC používá stále méně, nahrazují ji metody SDS-PAGE, ELISA a CE [28].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Odběr vzorků jehlic smrku ztepilého byl prováděn Centrem výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i. v Jeseníkách v červnu 2014. K experimentu byly vybrány tři skupiny smrků: 13 stromů rostoucích v nízké nadmořské výšce (400 m. n. m. – skupina L), 13 stromů ze střední nadmořské výšky (720 m. n. m. – skupina M) a 13 stromů z vysoké nadmořské výšky (1100 m. n. m. – skupina H). Z každého stromu byly odebírány stinné a slunné jehlice. Celkem tedy bylo 78 vzorků. Odebrané vzorky byly zváženy (hmotnost jednoho vzorku byla asi 100 mg) a okamžitě vloženy do mikrozkuhavky Eppendorf a ponořeny do termosky s tekutým dusíkem.

3.2 Stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE

Stanovení obsahu Rubisco bylo prováděno podle metody použité Damervalovou a kol. [31] a Rogersem a kol. [32] a upravené Floriánem [33] a Zachovou [34].

3.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC firmy HELAGO® CZ Hradec králové – parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI

Centrifuga MLW T52.1

Vortex – Stuart formy MERCI s.r.o.

Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN (Riga, Lotyšsko)

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 firmy BIO-RAD (USA)

Zdroj Power Pac 300 firmy BIO-RAD (USA)

Třepačka LT2

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid (SERVA)

Brilantní modř G 250 – Coomasie (SERVA)

Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)

Buthanol (Lachema)

D-Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa izolovaná ze špenátu – standard Rubisco (Sigma ALDRICH)

Ethanol (Lachema)

Glycerol (Sigma ALDRICH)

Glycin (SERVA)

Kyselina chlorovodíková (Penta)

Kyselina octová (Lachema)

2-Merkaptoethanol (Sigma ALDRICH)

Methanol CHROMASOLV® (Seidel-de-Haën)

N,N'-Methylenbisakrylamid (SERVA)

Peroxodisíran amonný (SERVA)

SDS-dodecylsulfát sodný (Sigma ALDRICH)

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (SERVA)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma ALDRICH)

3.2.3 Příprava roztoků

3.2.3.1 *Roztoky pro přípravu gelů*

Roztok A: Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 29,2 g akrylamidu a 0,8 g. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok B: V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 8,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok doplněn vodou na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok C: V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok doplněn vodou na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok D: Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 10 g SDS. Roztok je nutno chránit před světlem, proto se uchovává v temnu.

Roztok E: V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,1 g peroxodisíranu amonného. Roztok je nutné připravit pro každé stanovení čerstvý.

Roztok F: V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 10 mg bromfenolové modři. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

TEMED: komerčně dodávaný roztok

3.2.3.2 *Pomocné roztoky*

Elektrodový pufr: V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a používá se opakovaně.

TRIS pufr: Ve 450 ml destilované vody bylo rozpuštěno 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5 ml merkptoethanolu a 50 ml. Po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí koncentrované HCl. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Vzorkový pufr: Bylo smícháno 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkptoethanolu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.2.3.3 *Roztoky k vizualizaci bílkovin*

Stabilizační roztok: Bylo smícháno 100 ml methanolu a 400 ml vody. Roztok byl opakovaně používán a uchováván při laboratorní teplotě.

Barvicí roztok: Bylo smícháno 0,5 g Coomassie Blue R, 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody. Roztok byl opakovaně používán a uchováván při laboratorní teplotě.

Odbarvovací roztok: Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

3.2.4 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla nejdříve omyta vodou, poté odmašťovacím přípravkem, následně byla opláchnuta destilovanou vodou a vyčištěna buničinou namočenou v ethanolu. Dále byla skla upnuta do stojanu tak, že větší sklo bylo vzadu. Spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem svrchu byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byly použity 10% separační gel a 5% zaostřovací gel.

3.2.4.1 *Separační gel*

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 1.

Tabulka 1: Objemy roztoků k přípravě 10% separačního gelu (30 ml)

Roztok	Objem [ml]
Destilovaná voda	11,9
A	10,0
B	7,5
D	0,3
E	0,3
TEMED	0,012

Roztok E a roztok TEMED byly přidány těsně před nalitím roztoku mezi skla. Následně byl roztok nalit mezi skla, do výšky asi 2 cm od horního okraje. Zbýlý roztok byl ponechán v kádince pro kontrolu ztuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl převrstven asi 5 mm vrstvou butanolu, aby došlo k vyrovnání hladiny a jako ochrana proti vypařování vody. Po ztuhnutí separačního gelu byl butanol slit a gel byl několikrát promyt destilovanou vodou a přebytek vody se odsálo buničinou.

3.2.4.2 *Zaostřovací gel*

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 2.

Tabulka 2: Objemy roztoků k přípravě 5% zaostřovacího gelu (8 ml)

Roztok	Objem [ml]
Destilovaná voda	5,5
A	1,3
C	1,0
D	0,08
E	0,08
TEMED	0,008

Po přidání roztoku E a TEMED byl zaostřovací gel rovnoměrně nalit na vrstvu ztuhlého separačního gelu až po okraj a do prostoru mezi skly byl ihned vložen elektroforetický hřebínek tak, aby se v gelu nevytvořily bublinky. Hřebínek byl odstraňován po zatuhnutí gelu, až před nanášením vzorků, aby nedocházelo k vysychání gelu. Hotový gel je možné uchovávat v lednici, nejdéle však do druhého dne.

3.2.5 *Příprava standardu*

V mikrozkuhavce Eppendorf bylo rozpuštěno 1,2 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy v 1 ml vzorkového pufru. Směs byla promíchána na Vortexu a 5 minut vařena v termobloku při 100 °C. Po vychladnutí byl standard uchováván v mrazničce při teplotě -18 °C.

3.2.6 *Příprava vzorků*

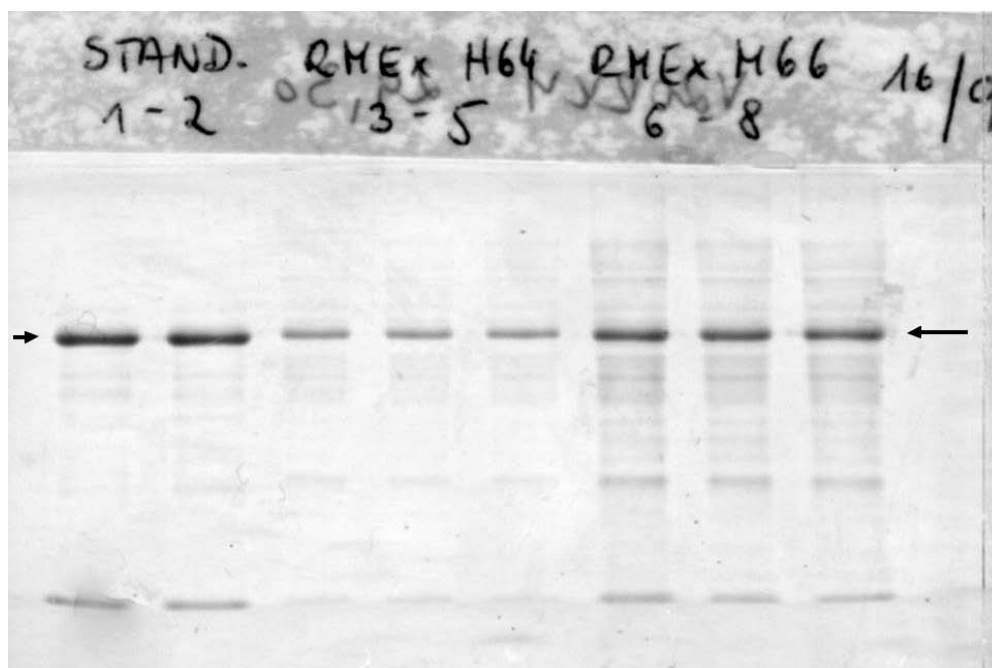
Navážka vzorku o známé hmotnosti byla rozetřena ve třetí misce s menším množstvím inertního mořského písku a 2 cm³ extrakčního pufru o pH 7,8. Suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a odstředována po dobu jedné minuty. Poté bylo odpipetováno 0,5 cm³ supernatantu do mikrozkuhavky Eppendorf k 0,5 cm³ vzorkového pufru. Tato směs byla promíchána na Vortexu a 5 minut povařena v termobloku při 100 °C. Po vychladnutí byly vzorky uchovávány v mrazničce při -18 °C.

3.2.7 Elektroforéza

Ze skel s připraveným a dokonale ztuhlým gelem byly odstraněny elektroforetické hřebínky, skla byla vytažena ze stojanu, očištěna od zbytků gelu a upevněna do stojanu pro elektroforézu větším sklem ven. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby, vnitřní prostor stojanu byl zcela naplněn elektrodovým roztokem a vnější prostor byl naplněn po rysku na vaně. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do prvních dvou pozic nanášeno 5 μ l standardu Rubisco a do každé další jamky bylo nanášeno 5 μ l vzorku. Takto připravena aparatura byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno konstantní napětí 80 V. V průběhu elektroforézy bylo nutné kontrolovat, jestli elektrodový pufr neprotéká z vnitřní části stojanu do vnější a případně pufr doplňovat. Elektroforéza trvala 90-120 minut, dokud čelo vzorku nedostoupilo asi 1,5 cm od spodního okraje gelu. Každý vzorek byl analyzován třikrát ($n = 3$), tedy nanášen do třech jamek.

3.2.8 Zviditelnění bílkovin

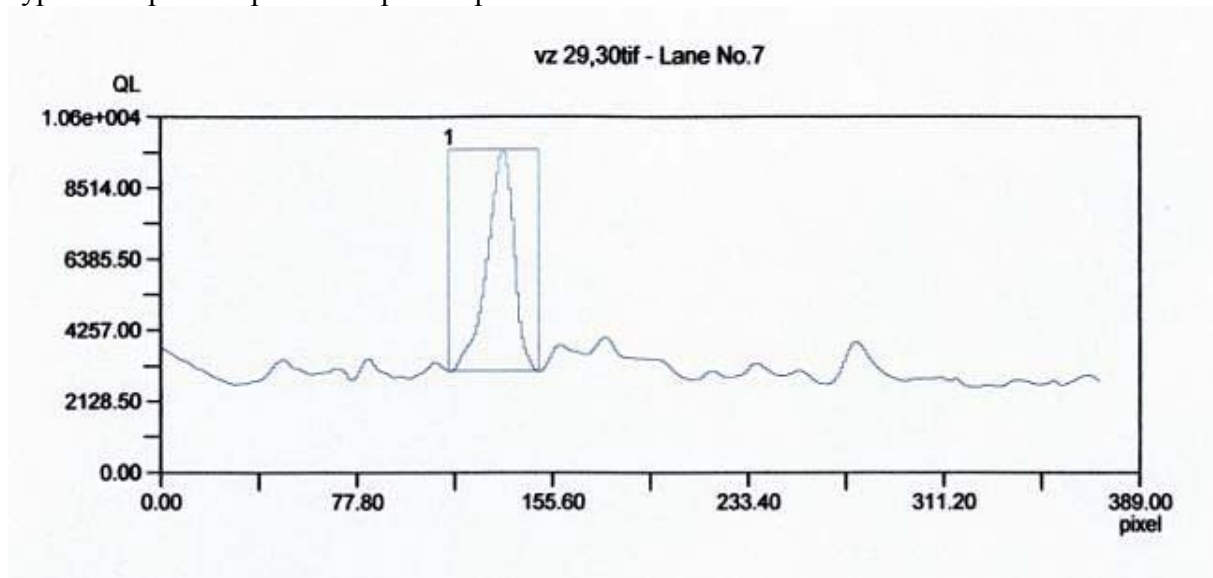
Po ukončení elektroforézy byla elektroforetická skla s gelem vyjmuta ze stojanu tak, aby pufr odtékl do vnější nádoby a ponořena do misky s destilovanou vodou menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle bylo spodní sklo odlepeno od gelu a gel byl pod vodou sejmut z horního skla. Voda byla vylita z misky a gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Poté byl stabilizační roztok slit a gel byl protřepáván 30 minut s barvicím roztokem. Po uplynutí této doby byl gel na třepačce promýván odbarvovacím roztokem po dobu 90 minut do dostatečného odbarvení. Po slití použitého roztoku byl gel promyt destilovanou vodou, položen na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie, která ho chránila před vysycháním. Hotové gely byly skladovány v chladničce při 4 °C. Při práci s gely bylo nutné po celou dobu používat ochranné gumové rukavice z důvodu vysoké toxicity akrylamidu.



Obrázek 13: Naskenovaný polyakrylamidový gel po elektroforéze. Zleva: dva sloupce (1-2) standardu Rubisco, další tři sloupce (3-5) vzorku slunných jehlic varianty H, poslední tři sloupce (6-8) vzorku slunných jehlic varianty M. Šipky ukazují zóny velké podjednotky Rubisco.

3.2.9 Vyhodnocení gelů

Hotové gely byly naskenovány do počítače pomocí HP Scanjet. Kvantifikace velké podjednotky enzymu Rubisco byla provedena programem Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X. Zóny velkých podjednotek enzymu Rubisco byly převedeny na píky (intenzita zbarvení proti vzdálenosti od okraje gelu) a integrací byla vypočítána jejich plocha. Velikost plochy byla přímo úměrná koncentraci bílkovin, proto byla koncentrace Rubisco ve vzorku vypočítána porovnáním plochy a koncentrace standardu. Protože poměr velikosti plochy a koncentrace standardu byl ovlivněn mnoha faktory, bylo nutné nanést standard Rubisco na každý gel. Pro přesnější výsledky byl standard na gel nanášen 2krát a vzorky 3krát, a pro výpočet se použila průměrná plocha píků.



Obrázek 14: Počítačová denzitometrie. Zóny rozdělených bílkovin, resp. jejich fragmentů, převedené na píky o ploše vyznačené na ose y (největší pík patří zóně velké podjednotky Rubisco).

3.2.10 Výpočet

Obsah enzymu Rubisco byl vypočítán z velikosti plochy standardu Rubisco o známé koncentraci, plochy zóny stanovovaného vzorku a jeho hmotnosti.

Vzorový příklad výpočtu obsahu:

Tabulka 3: Stanovení obsahu Rubisco v extraktu vzorku RMEEx L61

Název vzorku	Průměrná plocha píků [1]		Hmotnost vzorku [g]	Obsah Rubisco [mg(rub)·g(fw) ⁻¹]
	standardu	vzorku		
RMEEx L61	105 489,56	66 289,04	0,105	28,426 6

Pro stanovení byl použit standard o koncentraci 1,2 mg·ml⁻¹.

Obsah Rubisco vztažený na jednotkovou hmotnost jehličí:

$$c = \frac{P_{vz} \cdot c_{st} \cdot 4}{P_{st} \cdot m_{vz}} = \frac{66\,289,04 \cdot 1,2 \cdot 4}{105\,489,56 \cdot 0,105} = 28,426\,6 \text{ mg(rub)} \cdot \text{g(fw)}^{-1}, \quad (6)$$

kde P_{vz} je průměrná plocha píků vzorku ($n = 3$) [1],
 P_{st} je průměrná plocha píků standardu ($n = 2$) [1],
 c_{st} je koncentrace standardu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$],
 m_{vz} hmotnost vzorku [g],
a rovnice je násobena koeficientem ředění [ml] o hodnotě 4.

3.2.11 Statistické zpracování výsledků

Ze tří zjištěných ploch píků vzorku byl vypočten průměr, který byl následně použit pro výpočet obsahu Rubisco. Plocha píku standardu byla zprůměrována ze dvou hodnot zjištěných vždy z každého gelu.

Pro každou nadmořskou výšku byly výsledné hodnoty třinácti vzorků (resp. 10, 11 či 12, po vynechání odlehlých hodnot) opět zprůměrovány. Pro statistické vyhodnocení bylo nutné vytvořit chybové úsečky. Z průměrné hodnoty obsahu Rubisco jednotlivých vzorků, například slunných jehlic smrku ztepilého z nízké nadmořské výšky L byla v programu Microsoft Excel pomocí funkce „SMODCH“ vypočtena standardní odchylka, která byla dále rozšířena o interval spolehlivosti 95 % pomocí funkce „CONFIDENCE“. Tyto hodnoty byly dosazovány do chybových úseček do grafu.

4 VÝSLEDKY

Pomocí metody SDS-PAGE a počítačové denzitometrie byl stanoven obsah enzymu Rubisco ve stinných a slunných jehlicích smrku ztepilého v gradientu nadmořských výšek. Výsledky udává tabulka 4 a obrázek 15. Z tabulky 4 byly odstraněny odlehlé hodnoty.

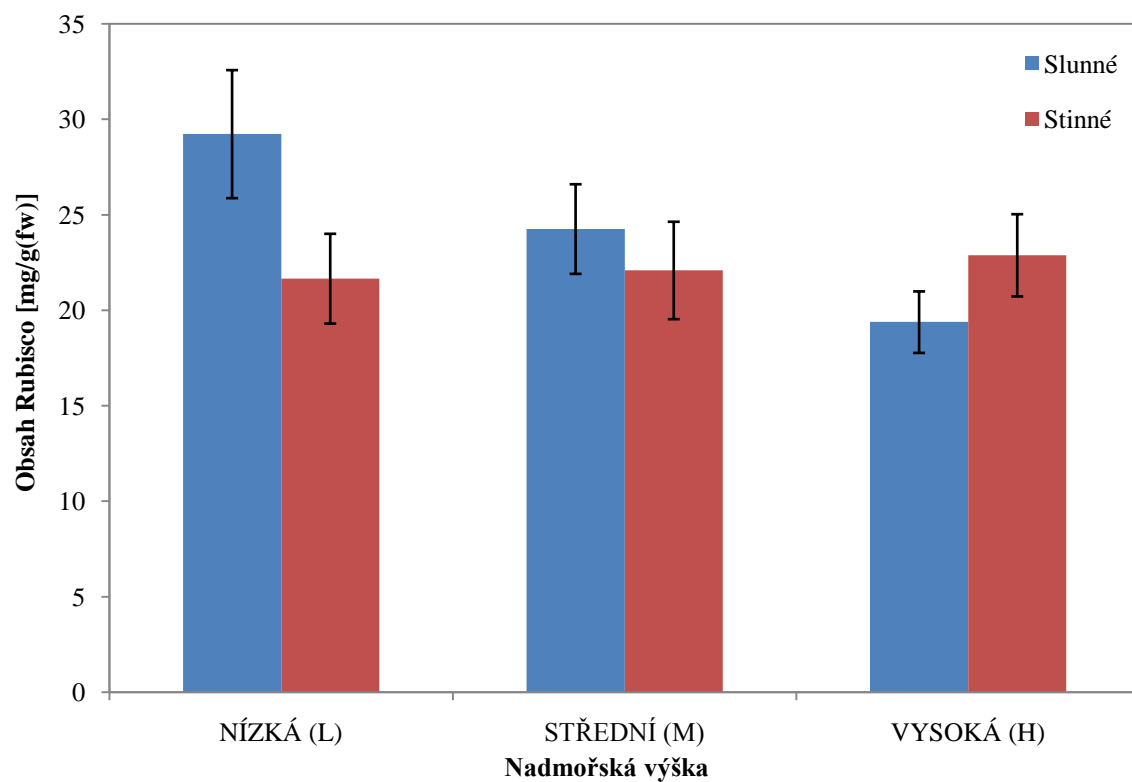
Tabulka 4: Výsledky obsahu Rubisco vztažených na jednotkovou hmotnost jehličí v $\text{mg(rub)} \cdot \text{g(fw)}^{-1}$

Číslo stromu	Obsah Rubisco [$\text{mg(rub)} \cdot \text{g(fw)}^{-1}$]					
	Slunné (Exposed)			Stinné (Shaded)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High
1	28,726 6	17,723 5	24,865 9	26,415 5	26,671 5	*
2	35,281 6	25,296 1	16,655 8	22,705 5	17,290 9	23,989 2
3	*	24,956 7	15,996 3	15,781 7	17,455 1	15,253 6
4	27,240 9	20,956 3	14,644 6	25,396 7	*	24,513 2
5	30,949 1	*	21,939 7	21,558 5	*	19,561 0
6	31,481 0	32,839 5	19,815 8	22,948 4	*	25,643 1
7	25,983 7	24,500 2	16,171 0	21,830 6	18,679 1	28,316 2
8	19,233 4	27,204 5	20,157 9	*	26,801 3	17,716 2
9	29,107 2	*	20,485 0	15,170 4	26,460 4	*
10	33,411 8	18,647 5	20,413 0	18,761 0	18,812 9	25,079 7
11	20,704 2	26,062 4	19,681 6	*	25,180 3	22,977 6
12	*	23,550 6	21,807 3	*	17,890 8	24,225 4
13	39,460 9	25,156 3	*	26,067 4	25,704 2	24,488 7
průměr	29,234 6	24,263 1	19,386 2	21,663 6	22,094 6	22,887 6

* odlehlé hodnoty

Z obrázku 15 je patrný statisticky významný pokles obsahu Rubisco u slunných jehlic s rostoucí nadmořskou výškou. U slunných jehlic varianty L byl obsah Rubisco o 17 % vyšší než u varianty M a o 34 % vyšší než u varianty H. U stinných jehlic naproti tomu nebyl prokázán významný vliv nadmořské výšky na obsah enzymu Rubisco.

U varianty L byl zjištěn významně vyšší obsah Rubisco ve slunných jehlicích ve srovnání se stinnými jehlicemi. U varianty M a H nebyl rozdíl v obsahu Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi statisticky významný.



Obrázek 15: Srovnání obsahu enzymu Rubisco mezi stinnými (shaded) a slunnými (exposed) jehlicemi smrku ztepilého v závislosti na nadmořské výšce jejich výskytu ($n = 13$). Chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.

5 DISKUSE

Obsah enzymu Rubisco v listech závisí na mnoha faktorech, z nichž na prvním místě je nutno zmínit dusíkatou výživu. U C_3 rostlin je přibližně 25 % dusíku vázáno v tomto enzymu. Dusík je přednostně alokován do mladých, rozvíjejících se listů, které mají největší obsah Rubisco. Urban a kol. [35] uvádí, že maximálního obsahu enzymu Rubisco rostliny dosahují v období plného rozvinutí listů a ke konci vegetační sezóny dochází k degradaci Rubisco a transportu dusíku do jiných částí rostlin. Při stárnutí listů se v listech akumulují sacharidy, jako např. glukosa a sacharosa, které potlačují expresi genů Rubisco *rbcS* a *rbcL* [36]. U jehličnanů je situace složitější. Asimilační aparát se buduje pomaleji a obsah Rubisco v mladých jehlicích se v průběhu sezóny zvyšuje, takže v září je významně vyšší než na jaře [35]. Teprve u jeden rok starých jehlic obsah Rubisco v průběhu sezóny klesá, podobně jako u listnatých stromů.

Dalším faktorem, který má vliv na obsah Rubisco v listech je teplota. Vyšší teplota zvyšuje intenzitu fotosyntézy a je jednou z příčin, proč jehlice smrků rostoucích v nižších nadmořských výškách obsahují více Rubisco. Práce Rajsnerové a kol. [37] dokazuje, že s nízkou růstovou teplotou, která odpovídá vyšším nadmořským výškám, se snižuje alokace dusíku ve vyšších vrstvách koruny buku lesního a dusík přechází do antistresových proteinů a vyvolává změny biochemického složení biologických membrán. Rajsnerová a kol. [37] zjistili pokles obsahu Rubisco na jednotku plochy listu s klesající nadmořskou výškou. Pokles byl více znatelný u letního sběru než u podzimního a obsah Rubisco v ozářených listech v září byl téměř dvakrát menší než v červnu. Stejně jako v naší práci množství Rubisco klesalo s nadmořskou výškou pouze u slunných listů. Ve vysoké nadmořské výšce docházelo k vyrovnávání obsahu Rubisco mezi stinnými a slunnými listy. Uvedené výsledky se shodují s výsledky naší práce a ukazují tak jen minimální rozdíly mezi vlivem nadmořských výšek na obsah Rubisco u buku a smrku.

Fakt, že stinné jehlice obsahují méně Rubisco než jehlice slunné, vysvětlují Leegood a kol. [16] adaptivními změnami chloroplastů ve stinných jehlicích, tj. urychlením vývoje tylakoidů a intenzivnější syntézou proteinů zachycujících světlo. Nátr [38] uvádí, že při nízkém osvětlení je omezena rychlost regenerace substrátu RuBP a dochází tedy ke snížení rychlosti fotosyntézy, jelikož při nedostatku ATP a NADPH je zpomalen přenos elektronů v tylakoidní membráně. Lichtenthaler a kol. [39] zjistili, že v rámci korunové vrstvy dochází k výraznému transportu dusíku, který je v největším množství lokalizován v horních, osvětlených vrstvách. Proto slunné listy obsahují i více enzymu Rubisco, což vede ke zrychlení asimilace CO_2 .

V této práci se podařilo prokázat statisticky významný rozdíl obsahu Rubisco mezi stinnými a slunnými jehlicemi smrku ztepilého pouze v nízké nadmořské výšce. Ve vyšších nadmořských výškách nebyl rozdíl obsahu Rubisco u stinných jehlic proti slunným statisticky významný. Jelikož při snižující se nadmořské výšce u slunných jehlic docházelo k poklesu obsahu Rubisco, zatímco u stinných jehlic neměl gradient výšek vliv na obsah Rubisco a ten tak zůstával relativně stejný, došlo ve střední a vysoké nadmořské výšce k vyrovnání obsahu Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi.

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že se vzrůstající nadmořskou výškou dochází k poklesu obsahu enzymu Rubisco v jehlicích smrku ztepilého. Dalším aspektem práce bylo porovnání obsahu Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi.

Odběr vzorků byl prováděn v Jesenících v letním období. Ve třech různých nadmořských výškách (400 m n. m., 720 m n. m. a 1100 m n. m.) byly sesbírány vzorky jehlic vždy ze třinácti různých stromů ($n = 13$). Z každého stromu byly odebrány slunné a stinné jehlice.

Pro separaci enzymu Rubisco byla použita metoda SDS-PAGE, kvantifikace obsahu Rubisco byla provedena počítačovou denzitometrií.

Výše uvedená hypotéza se potvrdila pouze v případě slunných jehlic, kdy obsah enzymu Rubisco klesal s rostoucí nadmořskou výškou téměř lineárně. Pro stinné jehlice se toto nepotvrdilo, obsah Rubisco v různých nadmořských výškách byl téměř konstantní.

Vyšší obsah Rubisco u slunných jehlic v porovnání se stinnými jehlicemi byl zjištěn pouze v nízké nadmořské výšce, kdežto ve střední a vysoké nadmořské výšce byl rozdíl v obsahu Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi statisticky nevýznamný.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] HRSTKA, M. *Biologie*, VUT Brno 2012.
- [3] Chlorophyll. *Food-Info* [online]. 2001 [cit. 2014-06-26]. Dostupné z: <http://www.food-info.net/uk/colour/chlorophyll.htm>
- [4] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995. 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.
- [5] Metabolismus sacharidů. *Moje chemie* [online]. © 2011-2014, 15.1.2012 [cit. 2014-06-26]. Dostupné z: http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Metabolismus_Sacharid%C5%AF#Fotosynt.C3.A9za
- [6] Fotosyntéza. *Studium biochemie* [online]. 2013 [cit. 2014-06-26]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/fotosynthese.html>
- [7] Fotorespirace. *Wikipedie* [online]. 24.6.2007, 3.2.2014 [cit. 2014-06-26]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotorespirace>
- [8] WILDMAN, S., BONNER, J.: The proteins of green leaves I. Isolation, enzymatic properties, and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. *Arch. Biochem.*, 1947, roč. 14, s. 381-413.
- [9] CALVIN, M., MASSINI, P.: The path of carbon in photosynthesis. XX. The steady state. *Experientia*, 1952, roč. 8, s. 445-457. ISSN 0014-4754.
- [10] QUAYLE, J. R., FULLER, R. C., BENSON, A. A., CALVIN, M. Enzymatic carboxylation of ribulose diphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, roč. 76, s. 3610-3611. ISSN 0002-7863.
- [11] WEISSBACH, A., SMYRNIOTIS, P. Z., HORECKER, B. L.: Pentose phosphate and CO₂ fixation with spinach extracts. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, roč. 76, s. 3611-3612. ISSN 0002-7863.
- [12] TROWN, P. W.: An improved method for the isolation of carboxydismutase. Probable identity with fraction I protein and the protein moiety of protochlorophyll holochrome. *Biochemistry*, 1965, roč. 4, s. 908-918. ISSN 0006-2960.
- [13] BOWES, G., OGREN, W. L., HAGEMAN, R. H.: Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, roč. 45, s. 716-722. ISSN 1090-2104.
- [14] ANDREWS, T. J., LORIMER, G. H., TOLBERT, N. E.: Ribulose diphosphate oxygenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction-I protein of leaves. *Biochemistry*, 1973, roč. 12, s. 11-18. ISSN 0006-2960.
- [15] LORIMER, G. H., ANDREWS, T. J., TOLBERT, N. E.: Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction products and mechanism of action. *Biochemistry*, 1973, roč. 12, s. 18-23. ISSN 0006-2960.
- [16] LEEGOOD, R. C., SHARKEY, T. D., VON CAEMMERER, S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000. ISBN 07-923-6143-1.
- [17] ŠÍPAL, Z. *Biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992, 479 s. ISBN 80-042-1736-2.
- [18] ANDERSSON, I., BACKLUND, A.: Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, roč. 46, s. 275-291. ISSN 0981-9428.

- [19] GUTTERIDGE, S., GATENBY, A. A.: Rubisco synthesis, assembly, mechanism, and regulation. *The Plant Cell*, 1995, roč. 7, s. 809-819. ISSN 1040-4651.
- [20] HARTMAN, F. C., HARPEL, M. R.: Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annual Review of Biochemistry*. 1994, roč. 63, č. 1, s. 197-232. ISSN 0066-4154.
- [21] PARRY, M. A. J., KEYS, A. J., MADGWICK, P. J., CARMO-SILVA, A. E., ANDRALOJC, P. J.: Rubisco regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany*, 2008, roč. 59, č. 7, s. 1569-1580. ISSN 0022-0957.
- [22] WINGLER, A., LEA, P. J., QUICK, W. P., LEEGOOD, R. C.: Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2000, roč. 355, č. 1402, s. 1517-1529. ISSN 0962-8436.
- [23] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-7080-586-2.
- [24] Protein Electrophoresis Methods. *Bio-Rad* [online]. 2015 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-uk/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods>
- [25] KOBZA, J., SEEMANN, J. R.: Mechanisms for light-dependent regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Reno, 22 February, 1988 [online]. Ed. Winslow R. Briggs. Reno: University of Nevada, 1987, s. 3815-3819 [cit. 2015-04-15]. ISSN 1091-6490. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/85/11/3815.full.pdf>
- [26] SEEMANN, J. R., J. A. BERRY, S. M. FREAS, KRUMP, M. A.: Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity in vivo by a light-modulated inhibitor of catalysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1958 [online]. Ed. Olle Björkman, 1985, s. 8024-8028 [cit. 2015-04-15]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/82/23/8024.full.pdf>
- [27] EVANS, J. R., SEEMANN, J. R.: Differences between wheat genotypes in specific activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the relationship to photosynthesis. *Plant physiology* [online]. 1984, roč. 74, č. 4, s. 759 [cit. 2015-04-15]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/74/4/759.full.pdf+html>
- [28] KAŠIČKA, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. [online]. Praha: Česká společnost chemická, 1997, č. 91, s. 320-329 [cit. 2015-04-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf
- [29] WARREN, Ch. R., CHEN, Z., ADAMS, M. A.: Effect of N source on concentration of Rubisco in *Eucalyptus diversicolor*, as measured by capillary electrophoresis. *Physiologia Plantarum* [online]. Copenhagen: Munksgaard International Publishers, 200009, roč. 110, č. 1, s. 52-58 [cit. 2015-04-15]. ISSN 1399-3054. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2000.110107.x.
- [30] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody: Učebnice základů instrumentálních analytických metod*. 1. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902-1550-5.

- [31] DAMERVAL, C., DE VIENNE, D., ZIVY, M., THILLEMENT, H.: Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis*, 1986, roč. 7, č. 1, s. 52-54. ISSN 0173-0835.
- [32] ROGERS, A., ELLWORTH, D. S., HUMPHRIES, S. W.: Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity, a study on loblolly pine grown in elevated pCO₂. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52: 1555-1561. ISSN 0022-0957.
- [33] FLORIÁN, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Brno, 2006. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
- [34] ZACHOVÁ, L. *Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah a aktivitu enzymu Rubisco*. Brno, 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
- [35] URBAN, O., HRSTKA, M., ZITOVÁ, M., HOLÍŠOVÁ, P., ŠPRTOVÁ, M., KLEM, K., CALFAPIETRA, C., DE ANGELIS, P., MAREK, M. V.: Effect of season, needle age and elevated CO₂ concentration on photosynthesis and Rubisco acclimation in Picea abies. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012, roč. 58, s. 135-141. ISSN 0981-9428.
- [36] HRSTKA, M., ZACHOVÁ, L., URBAN, O., KOŠVANCOVÁ, M.: Seasonal changes of Rubisco activity and its content in Norway spruce exposed to ambient and elevated CO₂ concentrations. 2008. In: *4th Meeting on chemistry and life: book of abstracts*. Brno: VUT FCH, s. 657-659. ISBN 978-80-214-3715-9.
- [37] RAJSNEROVÁ, P., KLEM, K., HOLUB, P., NOVOTNÁ, K., VEČEŘOVÁ, K., KOZÁČIKOVÁ, M., RIVAS-UBACH, A., SARDANS, J., MAREK, M. V., PEÑUELAS, J., URBAN, O.: Morphological, biochemical and physiological traits of upper and lower canopy leaves of European beech tend to converge with increasing altitude. *Tree Physiology*. 2015, roč. 35, č. 1, s. 47-60. ISSN 0829-318X.
- [38] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257 s. ISBN 80-858-6662-5.
- [39] LICHTENTHALER, H. K., AČ, A., MAREK, M. V., KALINA, J., URBAN, O.: Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiology nad Biochemistry*. 2007, roč. 45, č. 8, s. 577-588. ISSN 0981-9428.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2CA1P	2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát
3-KABP	3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát
a kol.	a kolektiv
Asn	asparagin
ATP	adenosin-5' -difosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
CABP	2- ¹⁴ C-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát
CE	kapilární elektroforéza
CO ₂	oxid uhličitý
DMPN	dimethylaminopropionitril
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCH VUT	Fakulta chemická Vysokého učení technického
Glu	kyselin glutamová
H	vysoká nadmořská výška (high)
H ₂ O	voda
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
L	nízká nadmořská výška (low)
L	velká podjednotka (large)
Lys	lysin
M	střední nadmořská výška (medium)
Mg ²⁺	hořečnatý kation
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
obr.	obrázek
PDBP	pentadiulosa-1,5-bisfosfát
RNA	kyselina ribonukleová
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
S	malá podjednotka (small)
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	tetramethylethylendiamin
Thr	threonin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	xylulosa-1,5-bisfosfát